Al Chiariss. Prof. P. Foà
Omaggio dell'A

ARCHIVIO

PER LE

SCIENZE MEDICHE

PUBBLICATO DA

G. BIZZOZERO (Torino) — C. BOZZOLO (Torino) — P. FOÀ (Torino)
C. GIACOMINI (Torino) — C. GOLGI (Pavia) — L. GRIFFINI (Genova)
N. MANFREDI (Pisa) — E. MARCHIAFAVA (Roma) — A. MOSSO (Torino)
L. PAGLIANI (Roma) — E. PERRONCITO (Torino) — E. SERTOLI (Milano)
C. TARUFFI (Bologna) — G. TIZZONI (Bologna)

E DIRETTO DA

G. BIZZOZERO

Estratto

TORINO E PALERMO
CARLO CLAUSEN

FIRENZE - ERMANNO LOESCHER - ROMA

1890

ARCHIVIO PER LE SCIENZE MEDICHE. — Vol. XV. N. 3.

Laboratorio di Patologia generale della R. Università di Torino
diretto dal Prof. G. Bizzozero

SULLA CONSERVAZIONE DELLE MITOSI
NEI
TESSUTI FISSATI PARECCHIE ORE DOPO LA MORTE

NOTA

DEL

Dott. **Rodolfo PENZO**

Si ritiene comunemente che nei tessuti fissati anche poche ore dopo la morte, e tanto più in quelli provenienti da cadaveri sezionati dopo le 24 ore, non si riscontrino figure cariocinetiche.

Questa opinione trova il suo fondamento in alcune osservazioni fatte dal Flemming sulle cellule a due nuclei, a proposito delle quali dice (1):

« (Ciò che fino ad ora, per quanto mi sappia, non è ancora stato preso in considerazione). Le scissioni nucleari già iniziate in tessuti morenti, possono dapprima ancora progredire, e, se l'energia del processo era abbastanza grande, condurre a complete scissioni cellulari, in caso contrario finiscono con una riduzione del processo, cioè con cellule a due nuclei,

(1) W. Flemming, « Ueber das Verhalten des Kerns bei der Zelltheilung und über die Bedeutung mehrkerniger Zellen ». (*Arch. f. Pathologische Anatomie und Physiologie, R. Virchow*. Bd. 77, S. 17).

mentre manca l'iniziarsi di nuove scissioni cellulari nel tessuto morente, o per lo meno accade assai di rado ».

Nello stesso luogo il Flemming, attenendosi all'opinione citata, ed ammettendo per il cancro e per gli altri tessuti dotati di rapido accrescimento una grande rapidità nello svolgersi del processo di scissione, si spiega come dieci minuti dopo la morte, o durante il raffreddamento, non si trovino più le mitosi in questi tessuti. A comprovare tale spiegazione, soggiunge com'egli, in una larva d'anfibio ed in embrioni di coniglio fissati una o due ore dopo la morte, ebbe a riscontrare pochissime mitosi e, invece, molte cellule con due nuclei, (cellule cioè, nelle quali s'era compita la scissione nucleare, non la cellulare) ; mentre in simili pezzi, se fissati subito dopo la morte, le mitosi si trovano assai numerose.

Da tutto questo il Flemming è condotto a concludere, che « per vedere le mitosi, si devono ricercare nei tessuti viventi, oppure mettere questi ancora vivi negli adatti liquidi conservatori ».

I medesimi concetti vennero più tardi brevemente riassunti così dallo stesso Autore (1):

« Wenn man Gewebe, die reichliche indirecte Zelltheilungen enthalten, absterben läst (z. B. Amphibienepithelien), so findet man nach einiger Zeit (bei Amphibien mehrere Stunden) darin keine oder nur ganz einzelne Theilungsfiguren, dagegen viel zahlreichere zweikernige Zellen, als sie im lebenskräftigen Gewebe vorkommen. Dies lässt sich kaum anders erklären als so, dass bei der abnehmenden Lebensenergie die begonnenen Theilungen in solchen Zellen es nicht zur Zelltheilung, sondern nur zur Kerntheilung gebracht haben ».

Da una tale conclusione formulata dal Flemming, così esperto in simili ricerche, si deve dedurre, che allorquando nell'esame istologico di un tumore, anche se questo fu fissato poco tempo dopo la morte, noi ricerchiamo le mitosi per giu-

---

(1) W. Flemming, « Zellsubstanz, kern und Zelltheilung ». Leipzig, 1882, S. 335.

dicare dal loro numero del potere d'accrescimento proprio al tumore, non dovremmo esser mai sicuri del nostro reperto, perchè, anche non avendo trovate che poche o nessuna mitosi, ci dovrebbe restare il dubbio che queste sieno scomparse col morire del tessuto.

La stessa incertezza riguardo al numero delle mitosi, si dovrebbe avere nell'esame di altri prodotti patologici o nello studio dello sviluppo ed accrescimento dei tessuti normali, quando i pezzi sottoposti all'esame provengano da cadaveri.

L'importanza pratica di questo dubbio giustifica le ricerche da me instituite, dietro consiglio e sotto la guida del Prof. Bizzozero, allo scopo di stabilire se realmente esista una differenza numerica fra le mitosi che si trovano nei tessuti ancor viventi, e quelle che si riscontrano nei tessuti fissati qualche tempo dopo la morte.

Erano pressochè ultimate le mie ricerche quando il Dott. Schenck (1) pubblicava i risultati di alcune osservazioni ch'egli fece su questo argomento, indotto dal fatto che il Prof. Bizzozero (2) nel suo lavoro « Sulla natura delle produzioni leucemiche secondarie » dichiara di aver constatate numerosissime le mitosi di leucociti in organi tolti a cadaveri di individui leucemici; il che non potrebbe essere ove le mitosi scomparissero con lo spegnersi della vita.

Nelle sue ricerche lo Schenck si servì del midollo tolto dal femore di un giovane coniglio, fissandone con differenti liquidi (liquido del Flemming, acido cromico 0,2 %, alcool) parte subito dopo la morte dell'animale, parte invece dopo mezz'ora, dopo 5 ore e dopo 24 ore, durante le quali, queste ultime porzioni di midollo venivano lasciate nel femore dell'animale alla temperatura dell'ambiente. Colorava i tagli ricavati dai differenti pezzi con sostanze atte a mettere in evidenza le mitosi, ma a preferenza con la fucsina Ziehl; e poi faceva il con-

---

(1) H. Schenck, « Uber Conservierung von Kerntheilungsfiguren ». Inaugural Dissert. Bonn. 1890.

(2) G. Bizzozero, *Arch. per le Scienze mediche*, vol. VIII, fasc. 2°, Torino 1885.

fronto fra il numero di mitosi che trovava in un campo di microscopio nei tagli di midollo fissato subito dopo la morte, ed il numero di mitosi che trovava in un campo di microscopio negli altri tagli di midollo, fissati a differenti periodi di tempo dalla morte.

Da queste ricerche, pur non escludendo che il Prof. Bizzozero abbia potuto riscontrare numerose mitosi nei suoi preparati di organi tolti a cadaveri, lo Schenck è però condotto a confermare l'opinione del Flemming, dichiarando che nel suo caso, già 5 ore dopo la morte del coniglio gli riesciva difficile riscontrare nel midollo da lui esaminato qualche rara mitosi, e che queste erano del tutto irriconoscibili nel midollo fissato 24 ore dopo la morte.

Inoltre, in base alle sue ricerche, lo Schenck crede di poter ancora affermare che l'alcool non serve bene a fissare le mitosi, perchè egli avrebbe veduto che con l'uso di questo molte mitosi scompaiono, anche se i tessuti vengano fissati subito dopo la morte.

Prima di passare alle mie ricerche, avendomi il Prof. Bizzozero permesso di esaminare i preparati relativi al suo lavoro sulle produzioni leucemiche secondarie, devo pienamente confermare quanto scrisse in proposito sul numero delle mitosi; e di più devo aggiungere, che queste vi sono tutt'ora evidentissime, quantunque colorate col semplice metodo Gram (1).

Venendo ora alle mie ricerche, dirò anzitutto che le praticai in tessuti normali e patologici. Fra i primi mi parve ben adatto il duodeno di piccoli mammiferi, dove riesce facile il numerare e lo stabilire quante mitosi si trovino in un dato numero di tubi ghiandolari del Galeati. Quanto a tessuti patologici instituii le mie ricerche su pezzi di tumori, che potei avere appena estirpati, grazie alla gentilezza del Professore E. Bassini.

Per evitare le cause di errore, feci sempre il confronto nu-

---

(1) In quell'epoca il Prof. Bizzozero non aveva ancora perfezionato il suo metodo per la colorazione delle mitosi.

merico fra le mitosi riscontrate in due punti di uno stesso tessuto, vicini il più possibile fra loro; e questo perchè le mitosi, anzichè trovarsi uniformemente distribuite nei tessuti, si trovano assai spesso (per es. nei tumori) numerose in certi punti, scarse in altri.

Per questo, in ogni mia osservazione, tagliava un piccolo pezzo dal tessuto appena tolto dall'organismo vivente; tagliava ancora questo pezzo in due metà, fissandone una subito e l'altra diverse ore dopo (di solito 24, e sempre usando del medesimo liquido fissatore); e poi finalmente faceva dei tagli di eguale spessore (tagliando col microtomo i pezzi inclusi in paraffina) sulle due faccie che limitavano la superficie del taglio, che aveva diviso in due metà il pezzo primitivo. In questo modo mi riesciva di confrontare il numero delle mitosi esistenti in due porzioni di un medesimo tessuto, vicinissime fra loro, una delle quali era stata fissata subito dopo la morte, l'altra parecchie ore dopo.

Come liquido fissatore, mi servii a preferenza dell'alcool, come quello che è più usato nella pratica comune; non trascurai però di controllarne l'azione, usando anche altri liquidi generalmente riconosciuti come i più adatti in queste ricerche, come per es. quello del Flemming e quello del Kleinemberg. Per mettere in evidenza le mitosi, adoperai i metodi di colorazione proposti da Bizzozero (1); ebbi pure ottimi risultati dal metodo proposto da Martinotti e Resegotti (saffranina, alcool cromico, alcool assoluto, olio di bergamotto), nonchè dalla colorazione semplice con ematossilina, oppure da quella doppia con ematossilina e saffranina (ematossilina, saffranina, alcool leggiermente cromico, alcool assoluto leggiermente picrico, olio di bergamotto).

Ecco ora brevemente i risultati delle singole osservazioni:

---

(1) *Zeitschrift f. wiss. Mikroskopie.* Bd. III, pag. 24-27, 1886.

Osservazione I.

Duodeno di cane. — Un pezzetto venne fissato, subito dopo la morte dell'animale, con alcool; un altro pezzetto invece, venne mantenuto per 24 ore in una camera umida a temperatura variabile fra $+6°$ e $+12°$ centig. e poi trattato come il pezzo corrispondente fissato subito.

Nel primo pezzo numerai le mitosi in 765 tubi ghiandolari, nel secondo in 990, ed ho trovato (in media):

Nel duodeno fissato subito, su 100 tubi ghiandolari, mitosi 515.
Nel duodeno fissato 24 ore dopo, su 100 tubi ghiand., mitosi 528.

Osservazione II.

Duodeno di cane. — Procedetti in tutto come nel caso antecedente. Numerai le mitosi in 1140 tubi ghiandolari del pezzo fissato subito, ed in 1030 di quello fissato 24 ore dopo. Risultato:

Nel duodeno fissato subito, su 100 tubi ghiandolari, mitosi 1068.
Nel duodeno fissato 24 ore dopo, su 100 tubi ghiand., mitosi 1040.

Osservazione III.

Duodeno di mus musculus. — Invece dell'alcool adoperai il liquido del Kleinemberg. La camera umida contenente il pezzo da fissarsi 24 ore dopo la morte dell'animale, venne mantenuta alla temperatura di $+7°$ centigr.

Nel pezzo fissato subito numerai le mitosi in 860 tubi ghiandolari; in quello fissato 24 ore dopo in tubi 1070. Risultato:

Nel duodeno fissato subito, su 100 tubi ghiandolari, mitosi 325.
Nel duodeno fissato 24 ore dopo, su 100 tubi ghiand., mitosi 320.

Osservazione IV.

Duodeno di mus decumanus. — Come liquido fissatore adoperai l'alcool. Il pezzo di duodeno da fissarsi 24 ore dopo la morte, venne lasciato per questo tempo in sito nell'animale, alla temperatura di $+8°$, e poi trattato con alcool come il pezzo fissato subito.

Numerai le mitosi in 1350 tubi ghiandolari del pezzo fissato subito, ed in 970 di quello fissato 24 ore dopo. Risultato:

Nel duodeno fissato subito, su 100 tubi ghiandolari, mitosi 610.
Nel duodeno fissato 24 ore dopo, su 100 tubi ghiand., mitosi 628.

Osservazione V.

Piccolo papilloma asportato da una tonsilla. — Con un foratappi tagliai fuori dal tumoretto, appena estirpato, un piccolo cilindro di tessuto che divisi in due metà: una di queste la fissai subito con alcool, l'altra, dopo averla tenuta per 24 ore in camera umida alla temperatura dell'ambiente (+ 15° centig. circa), la trattai come la prima.

Il tumoretto risulta costituito da grandi papille di tessuto congiuntivo, rivestite da grossi strati di epitelio pavimentoso. Numerai soltanto le mitosi riscontrate nelle cellule epiteliali. Risultato:

Nel pezzo fissato subito, su 50 tagli, mitosi 1495.

Nel pezzo fissato 24 ore dopo, su 50 tagli, mitosi 1465.

Osservazione VI.

Carcinoma midollare dell'utero. — Procedetti come nel caso precedente, soltanto che la porzione di tessuto da fissare dopo qualche tempo, la conservai per sole 15 ore in una camera umida alla temperatura dell'ambiente (+ 15° centig. circa).

Il tumore presenta l'ordinaria struttura del cancro midollare. Dalla numerazione delle mitosi negli elementi epiteliali, mi risultò:

Nel pezzo fissato subito, su 20 tagli, mitosi 2030.

Nel pezzo fissato 15 ore dopo, su 20 tagli, mitosi 2110.

Osservazione VII.

Carcinoma midollare dell'utero, come nel caso precedente, solo che lasciai il secondo pezzo per 24 ore, anzichè per 15, nella camera umida. Risultato:

Nel pezzo fissato subito, su 20 tagli, mitosi 1466.

Nel pezzo fissato 24 ore dopo, su 20 tagli, mitosi 1420.

Osservazione VIII.

Ghiandola linfatica (dal mesenterio di un coniglio). — Levai la ghiandola dal mesenterio dell'animale appena ucciso, e con un rasoio la divisi in quattro parti. Due di queste le fissai subito: l'una con alcool, l'altra col liquido del Flemming; egualmente trattai le

altre due parti, dopo averle conservate per 24 ore in camera umida, alla temperatura di + 7° centig.

Risultato: Non si rileva alcuna differenza numerica apprezzabile fra le mitosi che si possono vedere in un campo di microscopio (oculare 2, obb. $^1/_{18}$ immers. omog. Zeiss), esaminando i tagli ottenuti dalle quattro porzioni nelle quali aveva divisa la ghiandola.

Da queste mie ricerche risulta che le mitosi non scompaiono dai tessuti, anche se fissati parecchie ore dopo la morte: infatti, almeno nei tessuti da me studiati, le ho sempre trovate in numero pressochè eguale tanto nei pezzi fissati ancora viventi, quanto in quelli corrispondenti fissati 24 ore dopo la morte.

Tale risultato del tutto diverso da quello avuto dallo Schenck nelle sue ricerche sul midollo osseo di coniglio, credo possa non escludere la possibilità di quanto il Flemming asserisce d'aver osservato nell'epitelio degli anfibi; perchè in questi animali è straordinaria la resistenza vitale dei tessuti anche se staccati dal resto dell'organismo (l'epitelio vibratile della rana ce ne offre un chiaro esempio): ed è perciò possibile che in questi, le mitosi si comportino come ritiene il Flemming.

A questo proposito però devo aggiungere, che avendo conservato per 24 ore in camera umida a temp. +7° centig., parte della milza di un tritone ben nutrito, della quale aveva esaminata, a fresco per dilacerazione, l'altra parte subito dopo la morte dell'animale, potei constatare benissimo in tutti e due i casi la presenza di numerosi globuli rossi del sangue in via di scissione; nelle mitosi fissate 24 ore dopo la morte dell'animale, non mi riescì di constatare altro se non che i filamenti cromatici s'erano molto gonfiati.

In tutti i pezzi da me fissati parecchie ore dopo la morte, le mitosi erano sempre evidentissime; e nel caso del carcinoma uterino fissato 15 ore dopo la morte, ottenni, con la doppia colorazione (ematossilina, saffranina, alcool cromico, alcool assoluto picrico, olio di bergamotto) delle bellissime figure cariocinetiche, nelle quali si vede assai bene anche il fuso acromatico.

Le sole alterazioni che potei rilevare nelle mitosi fissate 24 ore dopo la morte, consistono in una maggiore affinità dei filamenti cromatici per le sostanze coloranti adoperate, insieme ad un aspetto più grossolano dei filamenti stessi che appaiono molto rigonfiati.

Potei ancora persuadermi come l'alcool, sebbene meno adatto del liquido del Flemming, possa tuttavia usarsi con vantaggio, sia per fissare, sia per conservare le mitosi.

CONCLUSIONE.

Nell'esame istologico di tumori o di tessuti tolti a cadaveri, le mitosi si riscontrano egualmente numerose che nel tessuto vivente, anche se sono trascorse 24 ore dalla morte; resta però sempre, che le figure cariocinetiche più perfette si devono ricercare nei tessuti fissati ancora viventi, o subito dopo la morte.